



**Universidad Autónoma Metropolitana**

**Unidad Xochimilco**

**División de ciencias biológicas y de la salud**

**Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica**

**Informe de conclusión de Servicio Social**

**“Aislamiento de cepas de *E. coli* de patotipos EPEC y STEC en muestras de ungulados en cautiverio”**

**Presentador del Servicio Social**

**González Saiz Luis Enrique**

**Matrícula: 21G3027826**

**Asesores**

---

**Daniel Martínez Gómez**

**No. Económico 30356**

---

**Wendy Esperanza Ortiz López**

**No. Cédula 12273506**

**Lugar de realización:** Laboratorio de Microbiología Agropecuaria del departamento de Producción Agrícola y Animal, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana

**Fecha de inicio:** 15 de enero de 2024

**Fecha de término:** 29 de enero de 2025

## Introducción

La primera descripción de *Escherichia coli* fue realizada por el doctor alemán Theodor Escherich en 1885, quién la denominó como *Bacterium coli* (bacteria común del colon). Algunas décadas más tarde fue renombrada como *Escherichia coli*, en honor a su descubridor (Kaper, 2005). Se trata de un bacilo Gram negativo, no presenta formación de esporas y móvil a través de flagelos peritricos. Es el habitante intestinal comensal más frecuente entre los humanos y otros vertebrados, entre ellos los ungulados, lo que facilita su diseminación por medio del contacto directo o indirecto con heces (Dias, 2019). Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* viven de manera inofensiva en el colon, existen cepas que han desarrollado la capacidad de provocar enfermedades intestinales. Por ejemplo, cepas pertenecientes al patotipo de *E. coli* enteropatógena (EPEC), están frecuentemente asociadas con diarrea infantil y en algunos casos con vómitos y fiebre (Tamayo et al., 2021). Este patotipo presenta el gen de la intimina (*eae*) codificado dentro de la isla de patogenicidad LEE. Este patotipo a su vez se divide en 2 subgrupos; EPEC típica (tEPEC) y EPEC atípica (aEPEC) en función de la presencia o ausencia del plásmido BFP (Alonso, et al, 2017). Por otro lado, las cepas EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), se caracterizan por causar diarrea hemorrágica, que en ocasiones puede derivar en el desarrollo de síndrome urémico hemolítico (SUH). Su principal reservorio es el ganado bovino y las ovejas. Las STEC y EHEC son consideradas dentro de un linaje de producción de citotoxinas conocidas como toxinas *stx1* y *stx2* (Dos Santos et al., 2023). Entre los ungulados, los bovinos constituyen el reservorio por excelencia de los patotipos ETEC y STEC (Barreto et al., 2021). Así mismo el ganado bovino y otros rumiantes domésticos se consideran reservorios primarios de cepas de STEC. Dichas cepas frecuentemente son causantes de enfermedades intestinales en humanos, los cuales pueden adquirir una infección mediante la vía oral-fecal, al consumir alimentos o agua contaminados con heces. (Mengue, 2020). En el año 2012, en la Unión Europea el número de casos de infección por STEC en humanos fue de aproximadamente 6,000 casos al año, lo que marca la importancia de este grupo de patógenos (Dias et al., 2019).

## **Justificación.**

Más de un 60% de las enfermedades infecciosas en humanos son causadas por patógenos zoonóticos. Para entender los procesos subyacentes a la transmisión y fisiopatología de los patógenos zoonóticos se requiere de un conocimiento profundo de la ecología, la inmunología, la microbiología y especialmente de la evolución. En este aspecto se considera que *Escherichia coli* es un microorganismo modelo para el estudio de la evolución de la patogenicidad, básicamente porque posee una alta plasticidad genómica, que le permite encontrarse en un proceso de ganancia-pérdida de genes constante, incluyendo los asociados con la virulencia. Previamente nuestro grupo de trabajo había caracterizado 40 aislados de *E. coli* patógenas aisladas de carnívoros y bisontes de la reserva de Janos, Chihuahua, México. Los resultados de la caracterización de estas cepas mostraron una posible correlación entre polimorfismos de los factores sigma y la adquisición de genes de virulencia. Para esta fase del trabajo se busca recuperar cepas de *E. coli* de ungulados silvestres presentes en zoológicos. El análisis de estas cepas podrá establecer si los resultados anteriores son resultado de un fenómeno local presente en las cepas recuperadas de la población de bisontes de Janos, o es una condición presente en ungulados y carnívoros de distintas especies. La caracterización estará enfocada en dos aspectos básicos: la correlación entre grupos 1) filogenéticos, y 2) patotipos (STEC y EPEC). La idea es caracterizar las propiedades fundamentales que le permiten a *E. coli* llevar a cabo procesos evolutivos particulares en los animales silvestres.

## Marco Teórico

*Escherichia coli* es una bacteria gram negativa en forma de bacilo, con flagelos peritricos y no formadora de esporas, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* (Kylla et al., 2020). Las cepas de *E. coli* incluyen las comensales y patógenas, las primeras no tienen mecanismos de virulencia que les permitan establecerse como agentes patógenos en individuos sanos. No obstante, estas cepas pueden volverse patógenas mediante la adquisición de genes específicos para la producción de toxinas, y otros elementos asociados al desarrollo de enfermedades. Las cepas patógenas presentan distintos factores de virulencia, que les ayudan a causar daños en distintos huéspedes, incluidos humanos y otros mamíferos (Kylla et al., 2020). Las cepas de *E. coli* causantes de enfermedades intestinales, han sido clasificadas en patotipos o patovariedades, según sus mecanismos de patogenicidad, factores de virulencia y cuadro clínico. De manera general se describen seis patotipos intestinales; *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* adherente difusa (DAEC) (Rodríguez, 2002). Las cepas de EPEC, pueden ocasionar casos aislados o brotes de diarrea, que afectan principalmente a niños menores de 6 meses y 2 años. EPEC fue el primer grupo identificado serológicamente de *E. coli* que se asoció con casos de diarrea infantil. Este patotipo tiene la capacidad de adherirse a las células del epitelio intestinal, provocando la alteración del citoesqueleto y formación de estructuras similares a pedestales por la polimerización de actina debajo del sitio de unión. A este tipo de lesiones se le conoce como lesiones A/E (Attaching and Effacing), y para su desarrollo la bacteria transloca proteínas a la célula hospedera utilizando el sistema de secreción de tipo III (T3SS). Las proteínas que conforman este sistema se encuentran codificadas dentro de la isla de patogenicidad conocida como Locus of Enterocyte Effacement (LEE) (Rodríguez, 2002). La adherencia, por otro lado, está regulada por fimbrias o pilis llamados BFP, que se encuentran codificadas por el plásmido denominado factor de adherencia EPEC (EAF) (Rodríguez, 2002). El patotipo EPEC está dividido a su vez en 2 subgrupos; EPEC típica (tEPEC) y EPEC atípica (aEPEC) en función de la presencia o ausencia del plásmido BFP (Alonso et

al., 2017). Por otra parte, los cuadros clínicos en los brotes causados por EHEC se han caracterizado por presentar diarrea con sangre, dolor abdominal y fiebre. A este cuadro clínico se le denominó colitis hemorrágica (CH), que en cuadros más graves puede asociarse a casos de síndrome urémico hemolítico (SHU), que se caracterizan por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica (Rodríguez, 2002). Este patotipo comparte con EPEC la habilidad de producir lesiones de "Attaching and effacing" gracias a que ambas presentan la isla de patogenicidad LEE, pero se diferencian en la capacidad que tiene EHEC de producir toxinas denominadas toxinas shiga (Stx debido a la similitud con las toxinas de *Shigella dysenteriae*) o verotoxinas (VT-por el efecto citopático que producen en las células Vero) (Rodríguez, 2002). Dentro de los tipos patógenos de *E. coli* pueden existir variaciones denominadas serotipos según los antígenos presentes en su superficie. En un estudio donde se analizaron un total de 65 aislamientos para determinar su serotipo y subtipificación de *E.coli* productoras de toxinas shiga procedentes de heces y cadáveres de ganado, se pudo observar la presencia de los serotipos O157: H7, O91:H10, O112ac:H2, O128ac:H26, O70:H16 entre otros, los cuales están relacionados con brotes infecciosos transmitidos por alimentos (Rodríguez et al., 2020). Por otro lado, un estudio realizado al noreste de la India, se analizaron 457 muestras fecales provenientes de lechones con diarrea, donde se aislaron 1,286 cepas de *E. coli* de las cuales se encontró que 42 cepas (3.26%) poseían el gen *eae*, presente en el patotipo EPEC. (Hotterson et al., 2020). El hecho de que estas cepas patógenas puedan causar infección tanto animales como humanos se debe en gran medida a un amplio catálogo de atributos virulentos que esta bacteria posee (Barreto et al., 2021), gracias a la elevada transferencia genética que han presentado algunas cepas de *E. coli*. Por ejemplo, se ha reportado la aparición de cepas híbridas denominadas AESTEC, estas cepas híbridas cuentan con *stx1* y *stx2*, además de la presencia de la intimina (*eae*) y una hemolisina (*hylA*) (Barreto et al., 2021). Un estudio realizado en 2017, con distintas especies de ungulados silvestres, (ciervos, muflones, jabalíes, etc) y aves, mostró en un total de 326 aislamientos de *E.coli*, la presencia de cepas EPEC y STEC. En este estudio se identificaron 13 cepas pertenecientes a STEC (4.3%) y 10 cepas pertenecientes

a EPEC (3.3%), las cuales se recuperaron de 12 ciervos, 3 muflones, 6 jabalíes y 2 aves silvestres. De 304 animales estudiados, se identificó la presencia de STEC en el 7.6% de los ciervos, 3.3% de jabalíes, 1,3% de las aves silvestres y el 100% de los muflones. Demostrando que los rumiantes salvajes y aves silvestres en menor medida, son portadores importantes de cepas de *E. coli* que son potencialmente patógenas para el humano. (Alonso et al., 2017).

## **Objetivos**

### **General**

Aislar en muestras de heces de ungulados mantenidos en cautiverio, cepas de *E.coli* portadoras de genes *eae*, *perA*, *stx1* y *stx2* por medio de PCR.

### **Específicos**

- Estandarizar las condiciones para la detección múltiple de los genes *eae*, *stx1*, *stx2* y *perA*
- Aislar cepas de *E.coli* de muestras de heces de ungulados
- Identificar en las cepas recuperadas la presencia de los genes *stx1*, *stx2*, *eae* y *perA*
- Evaluar los resultados obtenidos

## **Métodos y diseño experimental**

Esta investigación es un estudio de tipo experimental descriptivo transversal donde se analizan muestras de heces de ungulados para identificar la presencia de cepas de *E.coli* de diferentes patotipos.

## Muestras

Se trabajaron un total de 29 muestras de heces de animales entre los que se encontraban ungulados y otras especies mantenidas en cautiverio en el Parque Ecológico Zacango, Toluca, Estado de México.

No. Muestra	Especie	Nombre científico	Identificación	Sexo
1	Borrego aoudad	<i>Ammotragus lervia</i>	Sin nombre	H
2	Cuyo	<i>Carva porcellus</i>	Sin nombre	-
3	Borrego cimarrón	<i>Ovis canadensis</i>	Sin nombre	-
4	Cabra	<i>Capra aegagrus hircus</i>	Sin nombre	M
5	Tigre de Bengala	<i>Panthera tigris tigris</i>	"Marceline"	H
6	Tigre Blanco	<i>Panthera tigris altaica</i>	"Toulouse"	M
7	Tigre	<i>Panthera tigris</i>	"Bigotes"	M
8	Ciervo Sika	<i>Cervus nippon</i>	Sin nombre	H
9	Ciervo rojo	<i>Cervus elapus</i>	Sin nombre	H
10	Gama	<i>Cervus dama</i>	"Fallow"	M
11	Búfalo cafre	<i>Syncerus caffer</i>	Sin nombre	H
12	Dromedario	<i>Camelus dromedarius</i>	"Camila"	H
13	Llama	<i>Lama glama</i>	Sin nombre	H
14	Alpaca	<i>Vicugna pacos</i>	Sin nombre	M
15	Rinoceronte	<i>Rhinocerotidae</i>	Sin nombre	H
16	Dromedario	<i>Camelus dromedarius</i>	"Rafael"	M
17	Yegua	<i>Equus caballus</i>	"Marian"	H
18	Pony Pinto	<i>Equus ferus caballus</i>	"Canelo"	M
19	Caballo	<i>Equus caballus</i>	"Baco"	M
20	Potrillo	<i>Equus caballus</i>	"Spirit"	M
21	Antílope Eland	<i>Taurotragus oryx</i>	Sin nombre	-
22	Borrego común	<i>Ovis aries</i>	Sin nombre	H
23	Antílope Blackbuck	<i>Antílope cervicapra</i>	Sin nombre	-
24	Capibara	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Sin nombre	-

25	Antílope acuático	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	“KED”	H
26	Cebra de grant	<i>Equus quagga boehmi</i>	Sin nombre	H
27	Antílope Eland	<i>Taurotragus oryx</i>	“Mamado Jr”	M
28	Jirafa	<i>Giraffa camelopardalis</i>	“Pata”	H
29	Tigre	<i>Panthera tigris</i>	“Princesa”	H

**Tabla 1.** Individuos cuyas muestras fueron analizadas

**1) Estandarización de la prueba de PCR para la detección de los genes *stx1*, *stx2*, *eae* y *perA***

Para la estandarización de la prueba de PCR para la detección de los genes se tomó una colonia de *E. coli* de las cepas EHEC y EPEC las cuales fueron crecidas previamente en agar MacConkey. Las colonias fueron inoculadas en caldo LB y se incubaron a 37°C durante 24h para obtener un crecimiento microbiano considerable para realizar la extracción de ADN.

**Extracción de ADN de las cepas EHEC y EPEC de *E. coli***

Los medios de cultivo líquidos fueron centrifugados a 3000rpm por 10min, posteriormente se descartó el sobrenadante. La extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo de sílica proporcionado por el laboratorio de microbiología agropecuaria. Las células fueron lisadas con solución de lisis total y solución de lisis simple. Los lisados se colocaron en microtubos de 1.5mL en los cuales se añadieron 30uL de una suspensión de partículas de sílica. El ADN unido a las partículas de sílica fue lavado con una solución de etanol al 70% y acetona. Finalmente, el ADN se recuperó en 40uL de TE. La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

### Reacción en cadena de la polimerasa para los genes *stx1*, *stx2*, *eae* y *perA*

El ADN extraído de ambas cepas fue empleado para llevar a cabo la estandarización de las condiciones para la PCR multiplex para la identificación de los genes asociados a la virulencia de *E. coli* utilizando los iniciadores que se muestran en la siguiente tabla.

Primer	No. de identificación	Secuencia	Tamaño (pb)
<i>Stx1-F</i>	833	5' TAT GTA GAT TCG CTG ATT GTC A 3'	508
<i>Stx1-R</i>	834	5' AGT GTT GTA CGA ATT CCC CT 3'	
<i>Stx2-F</i>	835	5' ATG AAG TGT ATA TTA TTT AAA TGG GTA CT 3'	257
<i>Stx2-R</i>	836	5' AAA ACG CGC CTG ATA GAC 3'	
<i>eae-F</i>	849	5' GCA TTT GGT CAG GTC GGA 3'	178
<i>eae-R</i>	850	5' TCG CCA CCA ATA CCT AAA CGG 3'	
<i>perA-F</i>	865	5' GTA GCT GCA TTC AAT ATC ATCT 3'	304
<i>perA-R</i>	866	5' GAC ATA GCC TAG TTT CCA G 3'	

**Tabla2.** Iniciadores utilizados para la prueba de PCR multiplex

Inicialmente, al ADN proveniente de *E.coli* de las cepas EPEC y EHEC se le realizó PCR de manera separada para observar los productos amplificados de forma independiente. Posteriormente se realizaron distintas combinaciones donde se pretendía identificar si era viable amplificar algunos productos en presencia de otros. Debido a que no en todas las combinaciones fue posible visualizar la amplificación

de uno o varios productos, se tomó la decisión de llevar a cabo las reacciones en dos distintas combinaciones en las que sí fue posible visualizar los productos de manera conjunta, siendo el primer grupo para identificar los genes *stx1* y *stx2*, y el segundo grupo para los genes *eae* y *perA*.

## **2) Evaluación de la presencia de los genes *stx1*, *stx2*, *eae* y *perA* en muestras de animales**

### **Extracción de ADN de colonias de *E.coli***

Para obtener las colonias aisladas de *E.coli*, se pesó 1g de heces y se colocaron en tubos falcon con 10mL de medio de cultivo caldo LB, se incubaron a 37°C durante 24h. Pasadas las 24h, se tomó una alícuota de 100µL del medio de cultivo y se transfirió a otro medio LB estéril, se agitó levemente y se dejó en incubación a 37°C durante 24h. Se tomó una alícuota de 100µL y se colocó en agar Eosina Azul de Metileno (EMB), extendiendo la alícuota por la superficie del agar con ayuda de un asa de vidrio, se dejó incubar a 37°C durante 24h.

Tras haberse incubado se observó crecimiento de colonias de color verde metálico, debido al indicador del medio de cultivo. Con ayuda de un asa recta, se tomaron las colonias que estuvieran aisladas de otras, y se sembraron en otro agar EMB hasta obtener 3 placas petri con grupos de 36 colonias por muestra. Se incubaron a 37°C por 24h

Al observar las 36 colonias de color verde metálico, se tomó una parte de cada colonia con las que nuevamente se inoculó medio de cultivo LB, obteniendo 1 tubo con caldo LB por placa petri. Los medios de cultivo se dejaron en incubación bajo las mismas condiciones. Para la extracción de ADN se siguió el protocolo de sílica.

Se evaluó la integridad del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Debido a que en ocasiones el pigmento verde metálico no era evidente durante el crecimiento de las colonias en agar EMB, se decidió cambiar el medio de cultivo LB por caldo lauril sulfato, para observar la presencia de coliformes mediante fluorescencia bajo luz UV. Se siguió el mismo procedimiento.

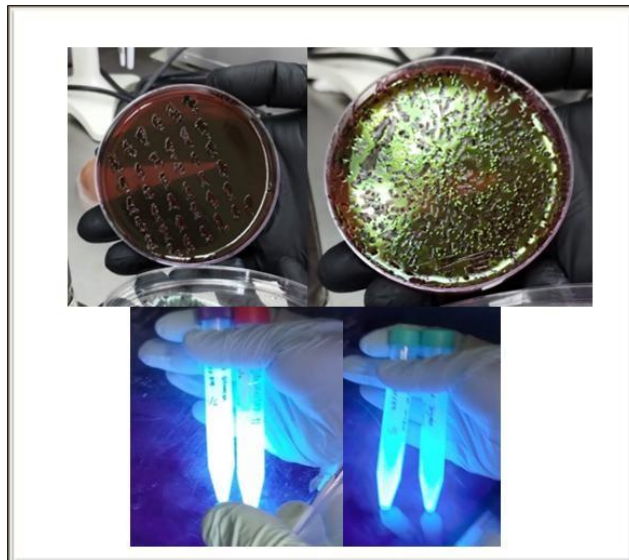
Para algunas cepas, la extracción de ADN se realizó directamente de un subcultivo proveniente de una alícuota de 100µL del cultivo principal de heces. Se siguió el mismo procedimiento para la extracción de ADN.

### **Reacción en cadena de la polimerasa para la evaluación de la presencia de los genes *stx1*, *stx2*, *eae*, y *perA***

A todas las muestras de ADN provenientes de los subcultivos de los cultivos principales de heces se les realizó PCR de manera individual siguiendo el procedimiento descrito en la prueba de estandarización.

### **Resultados**

Se analizaron un total de 29 cultivos bacterianos provenientes de muestras de heces de animales mantenidos en cautiverio en el parque ecológico de Zacango, Toluca, entre los que se encontraban distintos ejemplares de ungulados y otras especies, con el fin de determinar la presencia las cepas EPEC y EHEC de *E. coli*.

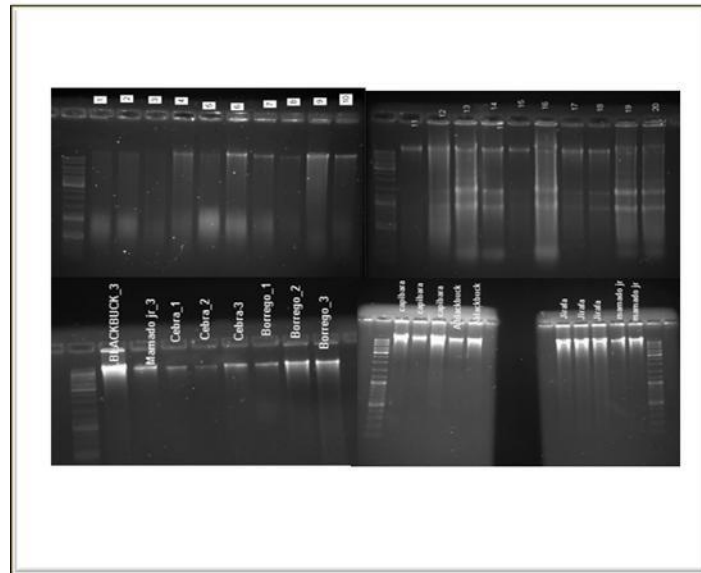


**Figura 1.** Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *E.coli*

En la **figura 1** se muestran los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *E.coli*. En la parte superior se observa cajas de agar EMB, en la parte inferior tubos con medio lauril sulfato.

Se elaboraron 24 placas petri con grupos de 36 colonias (3 placas por muestra), provenientes de cultivos líquidos en caldo LB, correspondientes a los individuos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28 en los cuales, se observó crecimiento de colonias verdes brillantes. Posteriormente, se desarrolló un subcultivo de las colonias en caldo LB y caldo lauril sulfato, un medio rico en nutrientes que permite un rápido desarrollo de microorganismos fermentadores de lactosa.

De cada subcultivo elaborado a partir de un cultivo principal que contenía la muestra de heces de los individuos 1 a 20 se recuperó el ADN directamente empleando la metodología antes descrita.

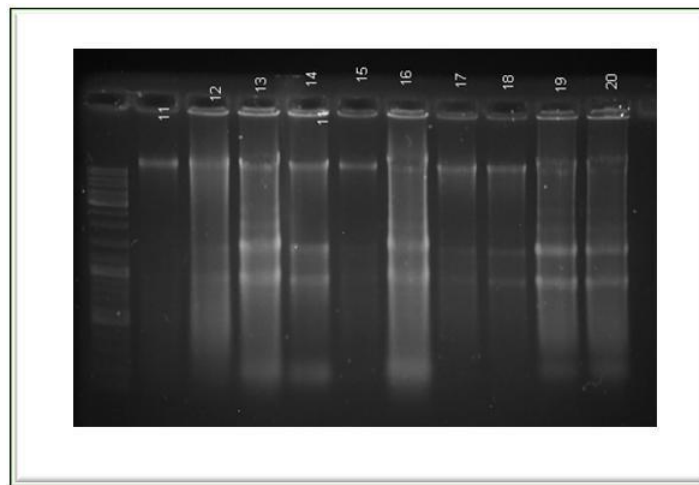


**Figura 2.** Extracción de ADN visualizado en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio

En la **figura 2**, se muestran los geles de agarosa correspondientes a las extracciones de ADN de los cultivos bacterianos de cada muestra de heces. Se extrajo el ADN de los 29 cultivos.

El ADN de los cultivos de los individuos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28 se extrajo tomando una parte de cada colonia crecida en las placas petri con grupos de 36 colonias que posteriormente se sembraron en tubos falcon con caldo LB, los cuales se dejaron en incubación. Una vez incubados, se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min para obtener la biomasa y descartar el sobrenadante. El ADN se extrajo siguiendo el protocolo de sílica.

El ADN de los cultivos de los individuos 1 a 20 se extrajo a partir de los subcultivos elaborados con una alícuota de 100µL del cultivo principal, el cual contenía la muestra de heces. Nuevamente los tubos fueron centrifugados a 3000rpm por 10min y se descartó el sobrenadante. La extracción se realizó siguiendo el protocolo de sílica.

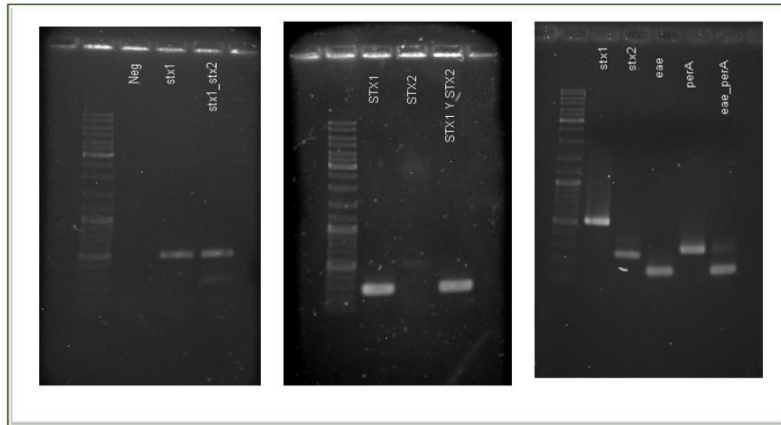


**Figura 3.** Extracción de ADN visualizado en gel de agarosa al 1% de los individuos 11 a 20.

En la **figura 3**, se muestra que la integridad del ADN proveniente de los subcultivos de los individuos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, y 20, en estos geles se observaron también, bandas que no estaban presentes en otras cepas. Estas bandas podrían corresponder con algún plásmido presente en los microorganismos cultivados.

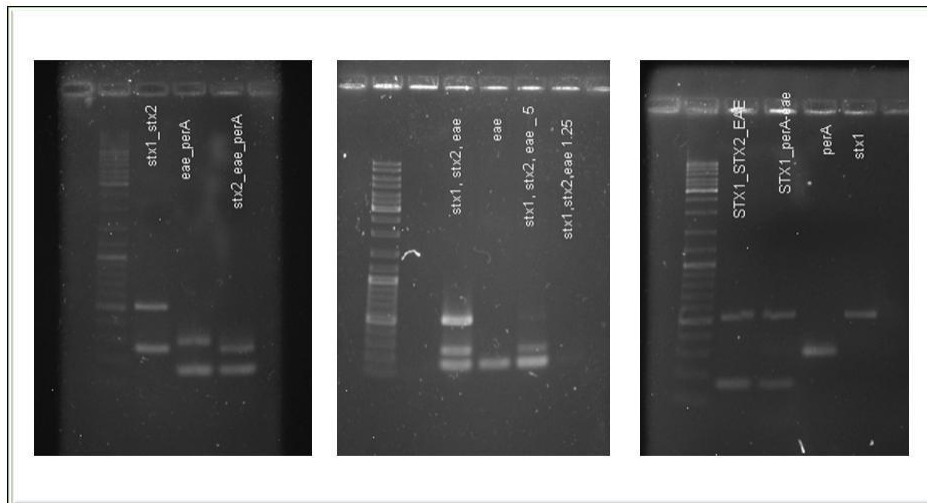
Para la estandarización de las condiciones de la PCR para la amplificación de los genes *stx1*, *stx2*, *eae* y *perA*, inicialmente se realizó la prueba al ADN extraído de las cepas EPEC y EHEC añadiendo los iniciadores correspondientes a los genes

*stx1*, *stx2*, *eae* y *perA* de manera separada, para visualizarlos de forma independiente



**Figura 4.** PCR multiplex para la estandarización de las condiciones de amplificación de los genes *stx1*, *stx2*, *eae* y *perA*

Posteriormente, en la **figura 5** se muestran las distintas combinaciones de iniciadores realizadas para determinar la viabilidad de amplificación de los productos en presencia de otros.



**Figura 5.** PCR multiplex visualizado en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio con las distintas combinaciones de iniciadores realizadas para determinar las condiciones de estandarización

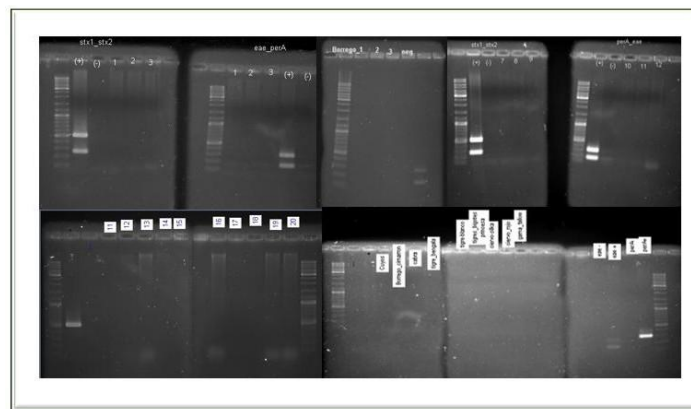
Tras observar los resultados obtenidos en la **figura 5** se decidió llevar a cabo las reacciones de PCR en dos grupos, siendo un grupo para la amplificación de los genes *stx1* y *stx2*, y el segundo grupo para la amplificación de los genes *eae* y *perA*.

En el primer grupo de reacción se añadió lo siguiente: en un tubo de 200 $\mu$ L se colocaron 10 $\mu$ L de una premezcla comercial (Thermo Scientific Fermentas PCR master mix), 1 $\mu$ L de ADN extraído de la cepa EHEC, 1 $\mu$ L de los iniciadores para *stx1* a una concentración de 1.25 $\mu$ M, 1 $\mu$ L de los iniciadores para *stx2* a una concentración de 5 $\mu$ M y 5 $\mu$ L de agua estéril hasta completar un volumen de 20 $\mu$ L. En el segundo grupo de reacción, se añadieron 1 $\mu$ L de los iniciadores para *eae* y *perA* a una concentración de 2.5 $\mu$ M, 1 $\mu$ L de ADN extraído de la cepa EPEC, 10 $\mu$ L de la premezcla comercial y 5 $\mu$ L de agua estéril hasta completar un volumen de 20 $\mu$ L.

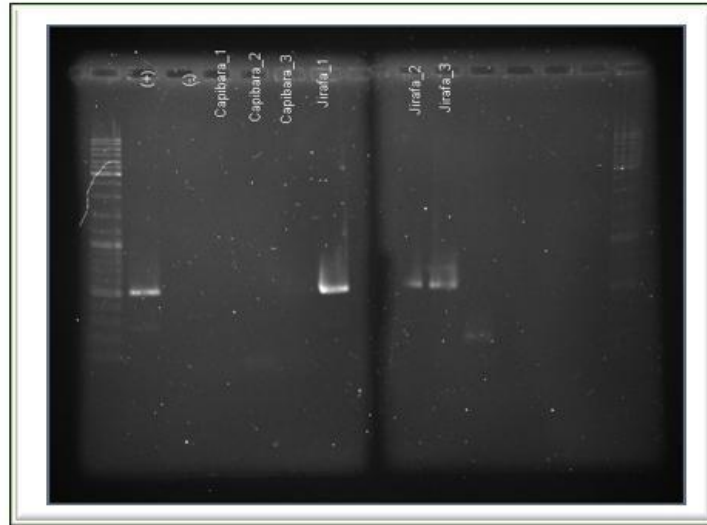
Las condiciones para la PCR multiplex fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial a 95°C por 5min, alineamiento a 56°C por 45s, una extensión a 72°C y una extensión final a 72°C por 5min durante 30 ciclos.

Posteriormente se realizó la PCR multiplex para la identificación de los genes *stx1*, *stx2*, *eae* y *perA*, cuyos resultados se muestran en la **figura 6**, de las 29 muestras, sólo una resultó positiva para *stx1* el cual se muestra en la **figura 7**.



**Figura 6.** PCR multiplex para la identificación de los genes *stx1*, *stx2*, *eae* y *perA*, visualizado en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio



**Figura 7.** PCR multiplex para la identificación de los genes *stx1* y *stx2* que muestra la amplificación del gen *stx1*.

En la **tabla 3** se resumen los resultados obtenidos en cada una de las PCR realizadas, especificando los resultados positivos y negativos para cada gen.

No. Muestra	Especie	Nombre científico	Identificación	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>perA</i>
1	Borrego aoudad	<i>Ammotragus lervia</i>	Sin nombre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	Cuyos	<i>Carva porcellus</i>	Sin nombre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Borrego cimarrón	<i>Ovis canadensis</i>	Sin nombre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	Cabra	<i>Capra aegagrus hircus</i>	Sin nombre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
5	Tigre de Bengala	<i>Panthera tigris tigris</i>	Marceline	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6	Tigre Blanco	<i>Panthera tigris altaica</i>	Toulouse	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
7	Tigre	<i>Panthera tigris</i>	Bigotes	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	Ciervo Silka	<i>Cervus nippon</i>	Sin nombre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	Ciervo rojo	<i>Cervus elapus</i>	Sin nombre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	Gama	<i>Cervus dama</i>	Fallow	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
11	Bufalo cafre	<i>Syncerus caffer</i>	Sin nombre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	Dromedario	<i>Camelus dromedarius</i>	Camila	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
13	Llama	<i>Lama glama</i>	Sin nombre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
14	Alpaca	<i>Vicugna pacos</i>	Sin nombre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15	Rinoceronte	<i>Rhinocerotidae</i>	Sin nombre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
16	Dromedario	<i>Camelus dromedarius</i>	Rafael	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
17	Yegua	<i>Equus caballus</i>	Marian	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
18	Pony Pinto	<i>Equus ferus caballus</i>	Canelo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19	Caballo	<i>Equus caballus</i>	Baco	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20	Potrillo	<i>Equus caballus</i>	Spirit	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
21	Antílope Eland	<i>Taurotragus oryx</i>	Sin nombre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22	Borrego común	<i>Ovis aries</i>	Sin nombre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
23	Antílope Blackbuck	<i>Antílope cervicapra</i>	Sin nombre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
24	Capibara	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Sin nombre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
25	Antílope acuático	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	KED	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
26	Cebra de grant	<i>Equus quagga boehmi</i>	Sin nombre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
27	Antílope Eland	<i>Taurotragus oryx</i>	Mamado Jr	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
28	Jirafa	<i>Giraffa camelopardalis</i>	Pata	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
29	Tigre	<i>Panthera tigris</i>	Princesa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

**Tabla 3.** Resultados de PCR para la identificación de los genes *stx1*, *stx2*, *eae* y *perA*

## Discusión

Con base en los resultados obtenidos, la ausencia de cepas de *E.coli* portadoras de los genes *stx1*, *stx2*, *eae* y *perA* en la mayoría de las muestras analizadas, es un hallazgo relevante en esta investigación. De los 29 cultivos analizados, únicamente en una de ellas (3.44%) se encontró la presencia del gen *stx1*, lo que sugiere una baja prevalencia de estas cepas en los animales estudiados. Estos resultados difieren de lo reportado en otras investigaciones, las cuales han catalogado a animales rumiantes como el ganado bovino, cabras, jabalíes, ciervos y otros animales domésticos y no domésticos como reservorios de las cepas STEC de *E.coli*. Por ejemplo, en un estudio realizado en Paraguay por Rivelli et al. (2020), se investigó la presencia de *E.coli* productora de toxina shiga (STEC) donde se analizaron 197 muestras de hisopado rectal en bovinos y se encontró que la mayoría de ellos (84%) eran portadores de la sepa STEC. También se amplificaron por PCR los genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *saa* y *ehxA*, siendo los más comunes *stx2* y *stx2/saa/ehxA*.

Por otra parte, investigadores como Silveyra et al. (2015) mencionan que se ha reportado el aislamiento de cepas EPEC de varias especies animales como vacas, cerdos, ovejas, cabras, venados y aves de corral que presentan cuadros diarreicos como los que no lo presentan. En cuanto a la frecuencia de aislamiento, estudios reportan que *E.coli* EPEC puede estar presente en una proporción variable. En el estado de Morelos, México, Tamayo et al. (2020) determinaron la frecuencia de patotipos diarreogénicos de *E.coli* que colonizan cerdos, para esto se analizaron 280 muestras de heces fecales y se obtuvieron 521 aislamientos, de los cuales 50 (9.6%) fueron positivos para al menos un gen de virulencia en 42 animales diferentes. Entre los aislados, se encontró que aproximadamente 33 aislamientos (6.5%) de *E.coli* de porcinos pertenecían al patotipo EPEC siendo el más frecuente, seguido por EHEC (2.3%) y otros patotipos como EIEC y ETEC (0.4%). Se debe considerar que la prevalencia de EPEC puede variar en relación con distintos factores como la especie hospedera, condiciones ambientales y prácticas de manejo hacia estos individuos (Alonso et al., 2017). Por otra parte, un estudio realizado por McKenzie et al. (2017) en el departamento de ecología y evolución

biológica de la universidad de Colorado, EUA, donde se revisaron los efectos del cautiverio en el microbioma intestinal de algunos mamíferos se observaron diferencias con respecto al estado en el que vivían dichos mamíferos, siendo en cautiverio y mamíferos en estado salvaje y concluyen que la diferencia en la comparación de los microbiomas de las especies mantenidas en cautiverio y las que se encuentran en estado salvaje es esperada ya que existe el factor de intervención humana.

Es importante recordar que esta investigación fue realizada con cultivos provenientes de heces fecales animales mantenidos en cautiverio, los cuales permanecen bajo condiciones controladas. Según un reportaje emitido por la Secretaría del Medio Ambiente (SEDEMA) en 2022, en los zoológicos de la Ciudad de México como en los de otros lugares del país es obligatorio que se lleven a cabo las actividades necesarias para promover la salud y resguardar el bienestar de la fauna que se encuentra bajo cuidado profesional, algunas de estas actividades incluyen tanto atención médico-veterinaria como actividades de medicina preventiva adecuadas para cada especie, además de otros puntos importantes como limpieza, higiene, vacunación, desparasitación así como regímenes nutricionales y alimentación. Estos factores tienen como objetivo evitar enfermedades, controlar y recuperar la salud de los ejemplares en caso de presentar alguna afección, lo que reduce en gran medida el riesgo de zoonosis. Esto se alinea con lo reportado por Miranda et al. (2022), donde se describe que antiguamente los zoológicos eran recintos donde únicamente se exhibían distintas especies de animales para el entretenimiento, siendo hasta la década de 1960 cuando los zoológicos comenzaron a tomar acciones para la conservación de las especies. También se menciona que hoy en día, los zoológicos son espacios mucho más complejos, ahora cumplen con funciones definidas como conservación, investigación y educación más allá del mero entretenimiento.

## **Conclusión**

El presente trabajo permitió la identificación de la presencia del gen *stx1* en un único cultivo de los 29 analizados, indicando una baja prevalencia de cepas de *E.coli* portadoras de genes como *stx1*, *stx2*, *eae* y *perA* lo que sugiere que las especies mantenidas en cautiverio analizadas presentan un bajo porcentaje de ser reservorios de cepas de *E.coli* EPEC y STEC en comparación con otros estudios donde se reporta que animales rumiantes y otros ungulados como cabras, cerdos, jabalíes o muflones son reservorios de dichas cepas. Esto está relacionado con distintos factores como las condiciones controladas dentro de los hábitats en los zoológicos, ya que estos se incluyen prácticas de manejo destinadas para preservar la salud y el bienestar animal como la medicina veterinaria, los procedimientos de limpieza y prevención de enfermedades, así como la reducción de los riesgos de zoonosis. Esta investigación resalta la importancia de continuar con las acciones de conservación y bienestar animal ya que no sólo contribuyen a la preservación de distintas especies, también contribuyen a la minimización de posibles riesgos a la salud pública.

## Bibliografía

Alonso, C. A., Mora, A., Díaz, D., Blanco, M., González-Barrio, D., Ruiz-Fons, F., Simón, C., Blanco, J., C Torres, C. (2017). Occurrence and characterization of STX and/or EAE-positive *Escherichia coli* isolated from wildlife, including a typical EPEC strain from a wild boar. *Veterinary Microbiology*, 207, 69-73. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.05.028>

Aspectos Generales de la patogénesis bacteriana. (s. f.). En *Microbiología e Inmunología online*. Recuperado 28 de enero de 2024, de <https://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter10.htm>

Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., C Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58-65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>

Dias, D., Caetano, T., Torres, R. T., Fonseca, C., C Mendo, S. (2019). Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in wild ungulates. *Science of The Total Environment*,

Dos Santos, GF, de Sousa, FG, Beier, SL et al. Cepas de *Escherichia coli* O157:H7 en canales de bovinos y su impacto en la cadena de producción animal. *Braz J Microbiol* 54 , 2243-2251 (2023). <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01034-x>

*E coli* enterohemorrágica. (s. f.). Centro para la Seguridad Alimentaria y Salud Pública. Recuperado 11 de enero de 2024, de <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/ecoli-es.pdf>

*E. coli* diarrogénicos y comensales en bovinos, implicaciones en la salud y la antibioterapia contemporánea. (2021). *Revista de producción Animal*, 33(2). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S222479202021000200055Cscript=sci\\_arttextCtIng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S222479202021000200055Cscript=sci_arttextCtIng=pt)

Estudio de la fauna silvestre como reservorio de cepas de *Escherichia coli* productoras de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y del grupo clonal pandémico ST131 en el noroeste de España. (2017). [Tesis doctoral]. Universidad de Santiago de Compostella.

Kaper, James B. (2005). Pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295, 355-356. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.06.008>

Kylla H, Dutta TK, Roychoudhury P, Subudhi PK, Lalhruaipuii, Lalsiamthara J, Mandakini R. Characterisation of Porcine Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated in Northeastern India. *J Vet Res*. 2020 Jul 14;64(3):391-397. doi: 10.2478/jvetres-2020-0046. PMID: 32984629; PMCID: PMC7497746.

Menge C. The Role of *Escherichia coli* Shiga Toxins in STEC Colonization of Cattle. *Toxins (Basel)*. 2020 Sep 21;12(9):607. doi: 10.3390/toxins12090607. PMID: 32967277; PMCID:

PMC7551371. Recuperado en 10 de enero de 2024, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7551371/>

Rivelli Zea, S. M., Padola, N. L., Etcheverría, A. I., Florentín, M., Acuña, P., Rodríguez, F., Colello, R., C Guillén Fretes, R. M. (2020). Caracterización molecular de aislamientos de Escherichia coli productores de toxina Shiga obtenidos en 2 establecimientos ganaderos del Paraguay. *Revista Argentina de microbiología*, 52(2), 131-135. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.07.001>

Rodríguez-Angeles, Guadalupe. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475. Recuperado en 15 de enero de 2024, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttextCpid=50036-36342002000500011CIng=esCtIng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttextCpid=50036-36342002000500011CIng=esCtIng=es). 9

Secretaría del Medio Ambiente, (2022). Los Zoológicos de la Ciudad de México mantienen las mejores condiciones de bienestar en los animales bajo su cuidado profesional. Secretaría del Medio Ambiente. Recuperado el 25 de enero de 2025, de <https://www.sedema.cdmx.gob.mx/comunicacion/nota/los-zoologicos-de-la-ciudad-de-mexico-mantienen-las-mejores-condiciones-de-bienestar-en-los-animales-bajo-su-cuidado-profesional>

Silveyra, I. M., Pereyra, A. M., Alvarez, M. G., Villagran, M. D., Baroni, A. B., Deza, N., Carbonari, C. C., Miliwebsky, E., C Rivas, M. (2015). Aislamiento de Escherichia coli enteropatógeno O157:H16 de un caso de diarrea infantil y sus contactos familiares en La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(4), 317-321. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.08.006>

Valerie J. McKenzie, Se Jin Song, Frédéric Delsuc, Tiffany L. Prest, Angela M. Oliverio, Timothy M. Korpita, Alexandra Alexiev, Katherine R. Amato, Jessica L. Metcalf, Martin Kowalewski, Nico L. Avenant, Andres Link, Anthony Di Fiore, Andaine Seguin-Orlando, Claudia Feh, Ludovic Orlando, Joseph R. Mendelson, Jon Sanders, Rob Knight, Los efectos del cautiverio en el microbioma intestinal de los mamíferos, *Integrative and Comparative Biology*, Volumen 57, Número 4, octubre de 2017, Páginas 690-704, <https://doi.org/10.1093/icb/icx090>